

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

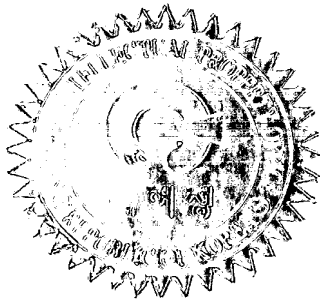
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0036249
Application Number

출원년월일 : 2002년 06월 27일
Date of Application JUN 27, 2002

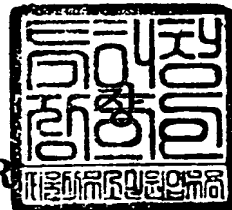
출원인 : 김대경
Applicant(s) KIM DAE KYONG



2003 년 06 월 24 일

특 허 청

COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.06.27
【발명의 명칭】	신규한 적혈구 세포질형 포스포리파아제 에이 투 효소, 그 에 대한 항체, 이들의 용도 및 제조 방법
【발명의 영문명칭】	Novel phospholipase A2 in the cytosol of red blood cell and the antibody against it, and the use and the preparation methods thereof
【출원인】	
【성명】	김대경
【출원인코드】	4-1999-053962-7
【대리인】	
【성명】	박승문
【대리인코드】	9-1999-000536-0
【포괄위임등록번호】	2002-047812-9
【대리인】	
【성명】	조용식
【대리인코드】	9-1999-000634-5
【포괄위임등록번호】	2002-047813-6
【대리인】	
【성명】	안소영
【대리인코드】	9-2000-000155-5
【포괄위임등록번호】	2002-047816-8
【발명자】	
【성명】	김대경
【출원인코드】	4-1999-053962-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유충규
【성명의 영문표기】	RYU, Chung Kyu
【주민등록번호】	520401-1000938



1020020036249

출력 일자: 2003/6/25

【우편번호】	110-813
【주소】	서울특별시 종로구 무악동 45번지 무악현대아파트 104-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신혜숙
【성명의 영문표기】	SHIN,Hae Sook
【주민등록번호】	640609-2695913
【우편번호】	712-908
【주소】	경상북도 경산시 하양읍 동서리 삼우 궁전아파트 가동 701호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정성윤
【성명의 영문표기】	JUNG,Sung Yun
【주민등록번호】	671220-1347948
【우편번호】	156-781
【주소】	서울특별시 동작구 상도5동 현대아파트 102동 704호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 박승문 (인) 대리인 조용식 (인) 대리인 안소영 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	24 면 24,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	10 항 429,000 원
【합계】	482,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	144,600 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 신규한 적혈구 세포질형 포스포리파아제 에이 투 효소(phospholipase A₂)인 rPLA₂, 그에 대한 항체, 이들의 용도 및 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 rPLA₂는 칼슘 이온에 의존적으로 아라키돈산을 생성하며, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 42KDa이며, 전기영동 하에서의 등전점이 pH 3.9~4.1이며, pH 9.5~10에서 최고의 활성을 나타내며, 특히 활성도(specific activity)는 5.6 nmol/min/mg임을 특징으로 한다.

본 발명의 rPLA₂ 항체는 본 발명의 rPLA₂에 특이적으로 결합할 수 있으며, 본 발명의 rPLA₂ 저해제인 EA4(7-chloro-6-[4-(diethylamine)phenyl]-5,8-quinoline dione)는 rPLA₂의 아라키돈산 생성 활성을 저해한다.

따라서, 본 발명의 rPLA₂와 그에 대한 항체 및 저해제는 적혈구가 관여하는 생리 현상의 연구 분야 및 rPLA₂와 관련된 질환의 진단, 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 2

【명세서】

【발명의 명칭】

신규한 적혈구 세포질형 포스포리파아제 에이 투 효소, 그에 대한 항체, 이들의 용도 및 제조 방법 {Novel phospholipase A2 in the cytosol of red blood cell and the antibody against it, and the use and the preparation methods thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 사람과 소의 적혈구에서 A23187에 의한 아라키돈산 분비를 시간별로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 소 적혈구와 돼지 지라를 다양한 컬럼으로 정제하고 그 결과를 비교하여 나타낸 도이다.

도 3은 모노 큐 고성능액체 컬럼까지 거친 소 적혈구의 단백질 용출액에 대해 SDS-PAGE를 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 rPLA₂를 기존의 PLA₂에 대한 항체와 반응시켜 면역침전을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 rPLA₂의 효소적 특성을 나타낸 도이다.

도 6은 컬럼 크로마토그래피를 통해 얻은 소 적혈구의 단백질 용출액에 대해 면역침전법을 수행하고, 각 용출액의 PLA₂ 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 다양한 종류의 세포와 조직에서 본 발명의 rPLA₂를 검출하고, EPO 처리에 의한 본 발명의 rPLA₂의 발현을 변화를 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 MFL 세포의 적혈구 분화 양상을 나타낸 도이다.

도 9는 MFL 세포의 적혈구 분화시 본 발명의 rPLA₂의 발현율을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 EA4의 PLA₂ 저해 작용 기작을 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 EA4를 이용하여 소의 적혈구에서 A23187에 의한 아라키돈산 분비를 저해한 결과를 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <12> 본 발명은 적혈구 세포질에 존재하는 신규한 포스포리파아제 에이 투 효소 (phospholipase A₂, 이하 PLA₂라 한다), 그에 대한 항체, 이들의 용도 및 제조 방법에 관한 것이다.
- <13> 적혈구는 칼슘 이온노포어(ionophore), 콜라겐(collagen), 트롬빈 (thrombin), 스트레스 등에 의해 유도되는 혈소판 응집을 현저히 증가시킨다. 또한 콜라겐에 의해 유도된 혈소판의 응집력도, 적혈구가 있을 때에 적혈구가 없을 때에 비하여 3배나 효과적이며, ADP의 방출량도 7배나 증가한다. 이같은 사실들은 적혈구가 혈소판의 병리학적 반응에 임상적으로 관여하고 있음을 의미한다.
- <14> 적혈구는 이온노포어 A23187나 스트레스에 의해 자극을 받으면, 세포막으로부터 PLA₂에 의해서 AA(arachidonic acid)를 유리한다. 유리된 AA는 이후의 대사 과정을 거쳐 에이코사노이드(eicosanoid)로 분해되는데, 사이클로옥시게나아제 (cyclooxygenase)에 의해 분해되면 프로스타글란딘(prostaglandin)을 형성하며, 프로스타글란딘이 근처의 혈

소판으로 유입되면 트롬복산(thromboxane)으로 전환되고, 리폭시게나아제(lipoxygenase)에 의해 분해되면 류코트리엔(leukotriene)을 생성하게 된다.

- <15> 에이코사노이드들은 호르몬과 같이 다양한 생리 작용의 메신저 역할을 수행하며, 혈관계에서는 적혈구 조혈, 염증 반응, 혈액 응고 및 혈압 조절 등의 현상에 관여한다.
- <16> 프로스타글란딘은 거의 모든 세포에서 만들어지는 에이코사노이드로, 혈관 수축을 촉진하며, 염증 반응시 통증에 대한 신경세포의 민감성을 높이고, 적혈구의 파괴 조절과 여과를 저해한다.
- <17> 트롬복산은 혈소판에서 생성되는 에이코사노이드로, 혈소판을 응집시키는 한편 혈류 속도를 감소시켜 혈액 응고 시간을 확보해 주는 등, 혈전 형성에 관여한다.
- <18> 류코트리엔은 백혈구에서 생성되며, 염증 반응 유발에서 중요한 역할을 담당하여 알레르기 반응 등을 유발한다.
- <19> 이들 에이코사노이드는 생체 내에서 반드시 필요한 조절 물질이나, 이들의 과잉 생성은 혈소판의 응집능을 높여 혈관 내 혈전 축적을 초래하고, 혈관의 과도한 수축을 유발할 수 있기 때문에, 동맥 경화, 뇌경색, 협심증, 심근경색, 만성적인 염증 증상, 면역 기능장애, 암 등의 질환을 유발하게 된다. 실제로 한국인의 사망 원인 중 혈전과 혈관 수축에 관련된 질환이 암에 이어 2위를 차지하는 것으로 보고되고 있어서, 이들 질환에 대한 대책이 시급하다.

- <20> 따라서 상기 질환들의 유발 기전을 밝히고, 진단, 예방 및 치료하기 위해서는, PLA₂의 적혈구형 구조에 대한 명확한 이해와 함께 상기 효소의 활성을 저해할 수 있는 물질에 대한 연구가 필요하다.
- <21> PLA₂는 크게 세포질에 존재하는 cPLA₂(cytosolic phospholipase A₂)와 세포 외부로 분비되는 sPLA₂(secretory phospholipase A₂)로 구분되며, 다양한 종의 동물과 조직에서 이들 PLA₂들이 분리되어왔다.
- <22> 반면 적혈구의 PLA₂에 대해서는 적혈구 막의 경우, 래트(rat)와 사람의 적혈구 막에서 PLA₂ 활성이 존재하는 것으로 나타났으며(Paysant M. et al., Bull. Soc. Chim. Biol. 52:1257-1269, 1970), 양의 적혈구 막에서 칼슘 의존적으로 아라키돈산 분비 활성을 나타내는 18.5KDa의 효소를 분리한 연구 결과(Kramer R. M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 507:381-394, 1978)만이 보고되었을 뿐이다.
- <23> 더우기 적혈구의 세포질형 PLA₂의 경우, 닭에서 칼슘 이온에 비의존적인 세포질형 PLA₂가 포스파티딜에탄올아민을 포스파티딜콜린으로 선택적 가수분해한다는 것을 발견한 것(Adachi, I., Toyoshima, S. & Osawa, T., Arch. Biochem. Biophys. 226, 118-124, 1983) 이외에는 그 연구 성과가 매우 미미하며, 상기 효소의 활성을 특이적으로 저해할 수 있는 물질에 대한 발명 또한 전무한 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <24> 상기 과제를 달성하기 위해, 본 발명에서는 신규한 적혈구 세포질형 PLA₂, 그에 대한 항체, 그들의 용도 및 제조 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <25> 본 발명은 신규한 적혈구 세포질형 포스포리파아제 에이 두 효소인 rPLA₂, 그에 대한 항체, 이들의 용도 및 제조 방법에 관한 것이다.
- <26> 본 발명의 rPLA₂는 칼슘 이온에 의존적으로 아라키돈산을 생성하며, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 42KDa이며, 전기영동 하에서의 등전점이 pH 3.9~4.1이며, pH 9.5~10에서 최고의 활성을 나타내며, 특이 활성도는 5.6 nmol/min/mg임을 특징으로 한다.
- <27> 본 발명의 rPLA₂는 적혈구를 파쇄하여 얻은 세포질 분획을 부틸 토요펄 소수성 컬럼(Butyl-Toyopearl hydrophobic column), 1차 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼(Phenyl-5PW hydrophobic HPLC column), DEAE-5PW 고압액체 컬럼(diethylaminoethyl-5PW HPLC column), 세파아크릴 S-300 젤 여과 컬럼(Sephacryl S-300 gel filtration column), 2차 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼, 수퍼로오스 12 젤 여과 고성능액체 컬럼(Superose 12 gel filtration FPLC column) 및 모노 큐 고성능액체 컬럼(Mono Q FPLC column)을 순서대로 이용하여 정제함으로써 얻는다.
- <28> 본 발명의 rPLA₂는 인지질의 sn-2 위치에 작용하여, 칼슘 의존적(Ca²⁺-dependent)으로 이들 인지질을 아라키돈산으로 분해할 수 있다.
- <29> 본 발명의 rPLA₂는 여러 인지질 중 특히 2-AA-GPC(1-Stearoyl-2-arachidonyl-sn-glycerol-3-phosphocholine)를 기질로서 가장 선호하며, 2-AA-GPC를 기질로 하여 아라키돈산을 생성할 때의 K_m 값은 13.9mM이고, V_{max} 값은 7.4 nmole/min/mg이다. 효소 활성에 있어서, 본 발명의 rPLA₂의 특이 활성도(specific activity)는 5.6 nmol/min/mg으로,

특이 활성도가 3,800~8,630 nmol/min/mg에 달하는 cPLA₂나 40~1,500 nmol/min/mg에 달하는 sPLA₂에 비해 매우 낮다. 그러나 적혈구는 혈액을 구성하는 세포 중 99%에 달하는 높은 비중을 차지하므로, 본 발명의 rPLA₂는 이러한 낮은 특이 활성도를 극복하고 적혈구와 관련된 대사 작용에서 중요한 역할을 담당할 수 있다.

<30> 본 발명의 rPLA₂는 기존의 cPLA₂와 마찬가지로, DTT(dithiothreitol), 그리고 sPLA₂ 저해제인 메파크린(mepacrine)에 대해서는 그 활성이 그다지 저해되지 않으나, cPLA₂ 저해제인 AACOCF₃(arachidonylfluoromethyl ketone)에 의해서는 그 활성이 저해되며, Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, 및 Mg²⁺ 등 2가 금속 이온(divalent cation)에 의해 활성화된다.

<31> 본 발명의 rPLA₂는 적혈구 전구 세포가 풍부하게 존재하는 MFL(murine fetal liver) 세포에서 특히 높은 발현율을 나타내지만, rPLA₂의 발현은 MFL 세포의 여러 유전자들의 발현을 활성화시키는 적혈구 조혈 인자인 EPO(erythropoietin)에 의해 유도되지 않는다. 그러나 MFL 세포에서 본 발명의 rPLA₂의 발현율이 높아짐에 따라 MFL 세포의 적혈구 분화가 유도되기 때문에, 본 발명의 rPLA₂는 EPO와는 다른 경로를 통해 적혈구 조혈 작용에 관여함을 알 수 있다.

<32> 이처럼 본 발명의 rPLA₂는 기존의 cPLA₂와 비슷한 기질 선호도, 칼슘 의존도, pH 의존도를 지니며, 여러 종류의 화학 물질과 이가 금속이온에 대해서도 비슷한 정도의 감수성을 나타내지만, 생화학적, 면역학적 및 특정 화학물질에 대한 감수성에 있어서, 기존의 cPLA₂와 비교하여 다음과 같은 차이점을 지닌다.

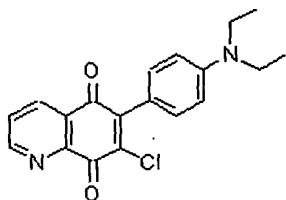


- <33> 생화학적 특성에 있어서, 본 발명의 rPLA₂는 여러 종류의 컬럼 크로마토그래피로 분석한 결과, cPLA₂와 상당히 다른 양상을 나타낸다.
- <34> 면역학적 특성에 있어서, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂나 sPLA₂에 대한 항체와 반응하지 않는다.
- <35> 화학물질에 대한 감수성에 있어서, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂나 sPLA₂와는 달리, 이들의 저해제로 알려진 메틸수은(methyl mercury), 염화수은(mercuric chloride) 및 TP1(2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chloro-1,4-naphthalene dione)에 의해 그 활성이 저해되지 않는다.
- <36> 본 발명에서는 또한 rPLA₂와 효율적으로 반응하는 rPLA₂ 항체를 제공한다.
- <37> 본 발명의 rPLA₂ 항체는 본 발명의 rPLA₂와 특이적으로 결합할 수 있으며, 사람 적혈구 세포질로부터 분리된 42KDa 단백질과도 반응하나, cPLA₂나 sPLA₂와는 반응하지 않는다.
- <38> 본 발명의 rPLA₂ 항체는 rPLA₂를 동량의 보조제(adjuvant)와 혼합하여 마우스에 주사한 후, 마우스로부터 혈청을 얻음으로써 제조된다. 보다 구체적으로는, 우선 소 적혈구로부터 얻은 rPLA₂의 활성 용출액에 대해, 0.25ml 당 25 μ g을 함유하도록 농축시킨다. 상기 농축된 단백질 용액을 동량의 보조제(adjuvant)와 혼합하여, 마우스의 복강 내로 주사한다. 3주 간격으로 4번 주사한 후, 마우스를 희생시켜 혈청을 얻음으로써, rPLA₂에 대한 항체를 함유하는 항혈청을 얻는다.



<39> 본 발명에서는 또한 rPLA₂ 저해제로 EA4(7-chloro-6-[4-(diethylamine)phenyl]-5,8-quinolinedione)를 제공한다. 본 발명의 EA4는 rPLA₂의 활성을 저해할 수 있는 퀴논 유도체로, 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

<40> 【화학식 1】



<41> 본 발명의 EA4는, 8-퀴놀린디온(quinolinedione)과 큐프릭 아세테이트 모노하이드레이트(cupric acetate monohydrate)를 디에틸아닐린(N, N-diethylaniline)과 반응시킴으로써 제조된다. 보다 구체적으로는 5, 8-퀴놀린디온과 큐프릭 아세테이트 모노하이드레이트가 각각 6.28mmol의 농도로 녹아있는 아세트산 용액 80ml에, 디에틸아닐린이 6.28mmol의 농도로 녹아있는 아세트산 용액 20ml을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 교반시키고, 하룻밤 동안 방치한 후 여과하여 침전물을 얻는다.

<42> 본 발명의 EA4는 130 μ M의 저해상수(K_i)를 가지고 경쟁적으로 rPLA₂의 활성을 저해할 수 있으며, 소의 적혈구에서 칼슘 의존적(Ca^{2+} -dependent)인 아라키돈산(arachidonic acid)의 방출을 저해한다.

<43> 또한 본 발명의 EA4는 어느 한 종류의 PLA₂만을 저해할 수 있었던 기존의 PLA₂ 저해제와는 달리, cPLA₂의 활성 또한 저해할 수 있다.



- <44> 따라서, 본 발명의 rPLA₂와 그에 대한 항체 및 저해제 EA4는 지혈(止血), 혈전증(血栓症), 적혈구조혈 등을 비롯하여 적혈구가 관여하는 생리 현상의 연구 및 rPLA₂와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- <45> 그 예로 본 발명의 rPLA₂의 발현, 기능 및 조절 기전 등이 밝혀지게 되면, rPLA₂에 의한 대사 산물들의 작용 경로와 이들이 관여하는 질병의 발생 기전 또한 밝혀질 수 있다. 또한 본 발명의 rPLA₂에 돌연변이를 일으켜 활성을 저하시키거나 비활성화시킴으로써, rPLA₂가 관여하는 질병을 진단, 예방 및 치료할 수 있다.
- <46> 또한 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체나 저해제는 rPLA₂에 의한 적혈구 생리 작용의 연구에 유용하게 사용될 수 있으며, 이들을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 rPLA₂ 저해제로 이용될 수 있다.
- <47> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은, 유효 성분으로 본 발명의 항체 또는 저해제 뿐 아니라 이들과 비슷한 기능을 지닌 물질 또는 유도체를 함께 첨가할 수 있으며, 필요에 따라 다른 유효 성분을 추가로 함유할 수 있다.
- <48> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- <49> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.



- <50> 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- <51> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 비교적 무독성이다.
- <52> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- <53> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우 1일 3회 투여시 일일 100 mg을 사용하는 것이 바람직하다.



- <54> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 혈전증, 동맥 경화, 뇌경색, 협심증, 심근경색, 만성적인 염증 증상, 면역기능장애, 암 등 rPLA₂의 과잉 활성화에 의해 유발되는 의한 질환의 진단, 예방 및 치료용 의약품으로 사용될 수 있다.
- <55> 본 발명의 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병행하여 사용할 수 있다.
- <56> 이하 하기 실시예에서 본 발명을 보다 상세히 설명하되, 하기 실시예에 의해 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.
- <57> [실시예 1] 본 발명의 rPLA₂의 제조 및 특성 확인
- <58> 1) 소와 사람의 적혈구에서 PLA₂ 활성 확인
- <59> 소와 사람의 적혈구에서 PLA₂의 활성이 존재하는지 확인하기 위해, 아라키돈산의 분비 활성을 측정하였다.
- <60> 도축장에서 소의 혈액을 얻고, 건강한 한국인 청년으로부터 사람의 혈액을 얻어, 각각 40U/ml의 농도가 되도록 헤파린(heparin)에 보관하였다. 500 ㄱ의 속도로 20분간 원심분리한 후, 그 결과 상층에 위치한 혈장, 백혈구-혈소판 층 등은 흡인기(aspirator)를 이용하여 제거하였다. 세포 침전물에 아직 남아있는 백혈구와 혈소판을 제거하기 위해, 멸균된 완충액에 세포 침전물을 재현탁하였다. 이때 사용된 완충액은 50mM 트리스(Tris-Cl, pH 7.5), 1mM EDTA, 0.12M 염화나트륨의 조성으로 이루어졌다. 그 후 다시 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 6번 반복하였다.

- <61> 그 결과 얻은 세포 침전물을 세척하여 10ml의 부피가 되도록 한 후, 0.9%(w/v) 염화나트륨 용액으로 평형시킨 세파로스 4B-200 칼럼(Sepharose 4B-200 column(20 × 2.5cm))으로 여과하여 백혈구와 혈소판을 제거하였다. 여과된 세포액에 대해, 세포측정기기(Bicton Dickinson UK)를 이용하여 그 수를 측정한 결과, 사람 혈액의 경우 적혈구 수는 $4 \sim 5 \times 10^9/\text{ml}$, 백혈구 수는 $2 \times 10^4/\text{ml}$, 혈소판 수는 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 개였으며, 소 혈액의 경우 적혈구 수는 $3 \sim 5 \times 10^9/\text{ml}$, 백혈구 수는 $3 \times 10^4/\text{ml}$, 혈소판 수는 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 개였으므로, 상기 과정을 통해 얻은 최종 세포들의 대부분은 적혈구임을 확인하였다.
- <62> 상기와 같이 준비된 사람과 소의 적혈구 각각을 ml당 $1.0 \sim 1.2 \times 10^9$ 개의 세포가 존재하도록 1mg/ml BSA를 함유하는 MEM 배지에 재현탁하여 2ml의 용액을 준비한 후, 지방산이 제거된 BSA가 1mg/ml의 농도로 녹아있는 무혈청 MEM 배지로 2번 세척하였다. 같은 배지에서 1시간 동안 $[^3\text{H}]$ 로 표지된 1.5 mCi/ml의 아라키돈산(이하 $[^3\text{H}]$ AA라 한다)와 함께 반응시켰다. 이때 사용된 $[^3\text{H}]$ AA는 에탄올에 1 mCi/ml의 농도로 녹여 사용하였다.
- <63> 세포를 MEM 배지로 3번 세척하여 배지에 남아있는 $[^3\text{H}]$ AA를 제거한 후, 1mg/ml BSA를 함유하는 MEM 배지에서 세포를 항온반응시킨 후, 37℃에서 2 μM 의 A23187과 함께 반응시켰다. 이때 대조군은 A23187을 첨가하는 대신, 배지 1ml 당 0.1 μl 의 에탄올을 첨가하는 조건으로 반응시켰다.
- <64> 세포와 A23187을 반응시킨지 0분, 10분, 30분, 60분, 90분이 될 때마다 세포를 취하여 원심분리한 후, 적혈구 현탁액인 상층액 200 μl 씩을 2.5ml의 액체섬광계수(scintillation counting) 용액과 혼합한 후, 팩커드 트리-카브 액체섬광계수기(Packard

tri-carb liquid β -scintillation counter, Packard Instrument co.)를 이용하여 방사능을 측정하였다.

<65> 방사능이 높게 측정될수록, 방사성 동위원소로 표지된 아라키돈산이 그만큼 많이 분비되었다는 것을 의미하므로, 상기 실험을 5번 반복하여 통계처리한 후 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<66> 도 1에 나타난 바와 같이, 사람과 소의 적혈구 모두에서 칼슘 이온노포어인 A23187에 의해 시간 의존적으로 아라키돈산의 분비가 증가되는 것으로 나타났다. 각 경우 모두 A23187과 반응시킨지 10분 후부터 아라키돈산의 분비가 시작되어, 60분까지 지속적으로 증가하였다.

<67> 따라서 사람과 소의 적혈구에서 칼슘 이온 의존적인 PLA₂ 활성이 존재함을 알 수 있다.

<68> 사람과 소의 적혈구에 존재하는 PLA₂가 어떤 타입의 PLA₂ 분류군에 속하는지 확인하기 위해, 소의 적혈구에 존재하는 PLA₂의 기질 선호도를 측정하였다.

<69> 소의 적혈구를 10000 \times g의 속도로 원심분리하여 상층액과 침전물을 각각 얻은 후, 각 분획에 대해 박막 크로마토그래피(thin layer chromatography)를 수행하여 PLA₂ 활성을 측정하였다. 이때 기질로 2-[1-¹⁴C]AA-GPC (55.3 mCi/mmol), 2-[1-¹⁴C]LA-GPC (1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine, 55.9 mCi/mmol), 2-[1-¹⁴C]PA-GPC (1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine, 55.6 mCi/mmol) 및 2-[1-¹⁴C]AA-GPE (1-acyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine, 55.1 mCi/mmol)를 각각 사용하였다.

- <70> 그 결과, 상층액 즉 세포질 분획은 2-[1-¹⁴C]AA-GPC를 2-[1-¹⁴C]LA-GPC보다 8.5배, 2-[1-¹⁴C]PA-GPC보다 25.2배, 그리고 2-[1-¹⁴C]AA-GPE보다 1.7배 높은 빈도로 기질로서 사용하였다.
- <71> 상기와 같은 2-[1-¹⁴C]AA-GPC에 대한 기질 선호도는 그룹 IV cPLA₂(group IV cPLA₂)의 공통된 특성이므로, 본 발명에서 분리하고자하는 소 적혈구의 PLA₂는 그룹 IV cPLA₂에 속하는 것으로 보인다.
- <72> 2) 소 적혈구 세포질로부터 본 발명의 rPLA₂ 분리 및 생화학적 특성 확인
- <73> 소 적혈구 세포질로부터 본 발명의 rPLA₂를 분리하기 위해, 소 적혈구 세포질에 대해 다양한 종류의 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 단백질을 정제하였다.
- <74> 이때 소 적혈구의 PLA₂와 보통의 그룹 IV cPLA₂의 생화학적 특성을 비교하기 위해, 대조군으로 cPLA₂가 풍부하게 존재하는 돼지의 지라 조직을 사용하여 같은 방법으로 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.
- <75> 상기 실시예 1의 1)과 같은 방법으로 소의 혈액 4ℓ로부터 적혈구를 얻고, 완충액 A(50mM 트리스, pH 7.5, 1mM EDTA, 10mM 머캡토에탄올(2-mercaptoethanol))에 재현탁시켰다. 이때 완충액 A에는 단백질의 분해를 방지하기 위해 1μg/ml 류펩틴(leupeptin), 5 mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 1mM DTT 및 1mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)가 함유되었다. 완충액 A에 재현탁된 세포를 초음파처리기(Sonic and Materials Inc.)로 빙욕(ice bath)에서 40W 출력, 40% 듀티 사이클(duty cycle)의 조건으로 20초간 파쇄한 후, 세포질 분획과 막 분획을 얻었다.

- <76> 3000 \times g, 4℃의 조건으로 30분간 원심분리하여 파쇄되지 않은 세포와 세포찌꺼기들을 제거한 후, 상층액을 다시 10000 \times g, 4℃의 조건으로 2시간 원심분리하여, 세포질 분획의 상층액과 막 분획의 침전을 각각 얻었다.
- <77> 세포질 분획을 0.5M 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate) 용액으로 맞춘 후, 4℃에서 5분간 잘 저어주었다. 부틸 토요펄 소수성 컬럼(Butyl-Toyopearl hydrophobic column, 15.0cm \times 5.0cm)를 0.5M 암모늄 설페이트를 함유하는 완충액 A로 평형시킨 후, 상기 세포질 분획을 분당 20ml의 속도로 컬럼에 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 증류수의 단계별 구배를 이용하여 분당 20ml의 속도로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시키고, 각 용출액에 대한 활성 분석 결과를 도 2a에 나타내었다.
- <78> 상기 과정을 통해 얻은 활성 용출액을 0.5M 암모늄 설페이트 용액으로 맞춘 후, 0.5M 암모늄 설페이트를 함유하는 완충액 A로 평형시킨 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼(Phenyl-5PW hydrophobic HPLC column, 21.3mm \times 15mm)에 분당 5ml의 속도로 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 0.5~0.0 M까지 농도 구배가 직선으로 이루어진 암모늄 설페이트 용액 100ml로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시키고, 각 용출액에 대한 활성 분석 결과를 도 2b에 나타내었다.
- <79> 상기 과정을 통해 5ml의 용출액을 얻고, 그 중 활성을 나타내는 분획을 완충액 A로 평형시킨 DEAE-5PW 고압액체 컬럼(diethylaminoethyl-5PW HPLC column, 7.5 mm \times 7.5cm)에 분당 0.1ml의 속도로 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 0.0~1.0 M까지 농도 구배가 직선으로 이루어진 염화나트륨 용액 20ml로 컬럼

에 흡착된 단백질을 용출시키고, 각 용출액에 대한 활성 분석 결과를 도 2c에 나타내었다.

<80> 상기 과정을 통해 1ml의 용출액을 얻고, 그 중 활성을 나타내는 분획을 0.1M 염화나트륨 용액으로 평형시킨 세파아크릴 S-300 젤 여과 컬럼(Sephacryl S-300 gel filtration column, 30mm ×60cm)에 분당 0.1ml의 속도로 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 분당 1ml의 속도로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시켰다.

<81> 상기 과정을 통해 얻은 활성 용출액을 0.5M 암모늄 설페이트 용액으로 맞춘 후, 0.5M 암모늄 설페이트를 함유하는 완충액 A로 평형시킨 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼(7.5mm ×7.5cm)에 분당 1ml의 속도로 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 0.5~0.0 M까지 농도 구배가 직선으로 이루어진 0.5M 암모늄 설페이트 20ml을 사용하여 분당 1ml의 속도로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시켰다.

<82> 상기 과정을 통해 얻은 활성 용출액을 센트리콘(centricon 10, Amicon Co.)을 사용하여 250 μ l로 농축하고, 0.1M 염화나트륨을 함유하는 완충액 A로 평형시킨 수퍼로오스 12 젤 여과 고성능액체 컬럼(Superose 12 gel filtration FPLC column, 10mm ×80cm)에 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 컬럼 평형에 사용된 것과 같은 용액으로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시키고, 각 용출액에 대한 활성 분석 결과를 도 2d에 나타내었다.

<83> 상기 과정을 통해 0.5ml의 용출액을 얻고, pH를 8.0으로 적정한 완충액 A로 평형시킨 모노 큐 고성능액체 컬럼(Mono Q FPLC column, 5.0mm ×5.0cm)에 분당 1ml의 속도로 통과시켰다. 더이상 단백질이 용출되지 않을 때까지 컬럼을 세척한 후, 0.0~1.0 M까지

1020020036249

농도 구배가 직선으로 이루어진 염화나트륨 용액 20ml로 컬럼에 흡착된 단백질을 용출시켜 1ml의 단백질 용출액을 얻어 이를 정량하였다.

<84> 단백질 정량은 280nm의 흡광도를 측정한 후, 브래포드 분석방법(Bradford assay, Bio-Rad)을 이용하였다.

<85> 도 2a~d에 나타난 바와 같이, 본 발명의 소 적혈구 세포질의 PLA₂는 모든 종류의 컬럼에서 cPLA₂와는 다른 시기에 용출되었다. 또한 본 발명의 PLA₂는 60Kd 정도의 분자량을 지니는 cPLA₂와 달리, 40Kd 정도의 분자량을 지닌 것으로 나타났다(도 2d).

<86> 따라서, 본 발명의 소 적혈구 세포질의 PLA₂는 기존의 cPLA₂와 그 생화학적 특성이 다르다는 것을 알 수 있다.

<87> 상기 컬럼 크로마토그래피 결과를 정리하여 표 1에 나타내었다.

<88> 【표 1】

정제 단계	총 단백질량 (mg)	총 활성도 (pmol/min)	수율 (%)	특이 활성도 (pmol/min/mg)	정제 배수
세포질 분획	46,000	18400	100.0	0.4	1
부틸 토요펠	700	7280	39.6	10.4	26
페닐-5PW(I)	37.50	4095	22.3	109.2	273
DEAE-5PW	7.00	1873	10.2	267.6	669
세파아크릴 S-300	1.70	1804	9.8	1061.2	2653
페닐-5PW(II)	0.52	656	3.6	1261.6	3154
수퍼로오스 12	0.25	412	2.2	1648.0	4120
모노 큐	0.06	336	1.8	5600.0	14000

<89> 표 1에 나타난 바와 같이, 소 적혈구의 현탁액이 처음의 두 컬럼을 거친 후 특이 활성도의 증가 정도, 즉 단백질의 정제 정도는 컬럼을 거치기 전의 세포질 분획에 비해 273배였으며, 수율은 23.3%였다. 수퍼로오스 12 젤 여과 고성능액체 컬럼을 거친 후 정

제 정도는 1.3배였으며, 수율은 62%였다. 모노 큐 고성능액체 컬럼을 거친 후 정제 정도는 3.4배였으며, 수율은 82%였다.

<90> 단백질의 정제 정도를 확인하기 위해, 모노 큐 고성능액체 컬럼까지 거친 용출액들에 대해 1차원 SDS-PAGE와 2차원 SDS-PAGE를 각각 수행하고, 그 결과를 도 3a와 도 3b에 각각 나타내었다.

<91> 도 3에 나타난 바와 같이, 1차원 SDS-PAGE 결과 모든 용출액에서 단백질 밴드는 42KDa 근처의 단일 밴드 하나만으로 나타났으며(도 3a), 2차원 SDS-PAGE 결과 마찬가지로 크기와 등전점 3.9~4.1 정도를 지닌 단일점으로 나타났다(도 3b). 2차원 SDS-PAGE를 수행하여 얻은 상기 단일점을 MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)로 분석한 결과, 상기 단백질은 기존에 알려진 어떤 단백질과도 상동성을 지니지 않는 것으로 나타났다.

<92> 따라서 본 발명에서 분리한 단백질은 소 적혈구의 신규한 단백질임을 알 수 있으며, 이 단백질이 소 적혈구의 세포질 PLA₂라고 전제하고 rPLA₂라 명명하였다.

<93> 3) 본 발명의 rPLA₂의 면역학적 특성 확인

<94> 본 발명의 rPLA₂에 대해 면역학적 특성을 확인하였다.

<95> 비교군으로 돼지 지라의 cPLA₂(이하 PS-cPLA₂라 한다)와 소 혈소판의 sPLA₂(이하 BP-sPLA₂라 한다)를 택하고, 각 효소에 대한 항혈청을 준비하여 다음과 같이 면역침전법(immunoprecipitation)을 수행하였다.

- <96> 각 혈청 50 μ l를 단백질 A-세파로스 CL-4B 비드(protein A-sepharose CL-4B bead) 50 μ l와 함께 혼합하였다. 상기 혼합액을 4℃에서 하룻밤 동안 항온반응시킨 후, 완충액 B(20 mM 트리스, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0%(w/v) BSA) 1ml로 6번 세척하였다.
- <97> 이렇게 하여 항체를 부착시킨 비드들을 수퍼로오스 12 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액, PS-cPLA₂ 또는 BP-sPLA₂와 각각 혼합하여, 4℃에서 진탕시켜주면서 항온반응시켰다. 비드를 1300 \times g의 속도로 4℃에서 1 분간 원심분리하여 비드를 침전시킨 후, 비드를 0.1% 트윈 20과 0.5 M 염화나트륨을 함유하는 완충액 B로 6번 세척하였다.
- <98> 세척된 비드를 10% 폴리아크릴아미드 겔에 걸어 전기영동 분석을 수행한 후, 겔 상에 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막(HybondTM ECLTM nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia UK Ltd.)으로 전이(transfer)시켰다.
- <99> 단백질이 전이된 막을 1차 항체와 반응시켰으며, 이때 각 항혈청의 희석 조건은 1:2000이었다. 1차 항체 반응 후, 2차 항체로 토끼 또는 마우스에 대한 염소의 항체에 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 결합된 것을 1:2500으로 희석하여 사용하였다. 항체 반응 후, 발색반응키트(1-StepTM NBT/BCIP, Pierce co.)를 사용하여 결과를 확인하고 도 4에 나타내었다.
- <100> 도 4에 나타난 바와 같이, 수퍼로오스 12 컬럼 그리고 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액들은 cPLA₂에 대한 항체와 반응하지 않았으며(도 4a), sPLA₂에 대한 항체와도 반응하지 않았다(도 4b).

- <101> 따라서 본 발명의 rPLA₂는 기존의 PLA₂와는 그 면역학적 특성이 다른 신규한 형태의 PLA₂임을 알 수 있다.
- <102> 4) 본 발명의 rPLA₂의 효소적 특성 확인
- <103> 본 발명의 rPLA₂의 특성을 확인하기 위해, rPLA₂의 효소 반응 속도, 기질 선호도, 칼슘 이온 의존도, pH 의존도, PLA₂ 저해제 및 이가 금속이온에 대한 민감도를 분석하였다.
- <104> 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액을 10mM 트리스(pH 7.5) 완충액으로 평형시킨 PD-10 디솔팅 컬럼(PD-10 desalting column)을 이용하여 염을 제거한 후, 다양한 농도의 2-[1-¹⁴C]AA-GPC와 항온반응시켰다. 라인웨버-버크(Lineweaver-Burk) 그래프를 작성한 결과(도 5a), 본 발명의 rPLA₂가 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 기질로 하여 반응하였을 때의 K_m 값은 13.9mM, 그리고 V_{max} 값은 7.4 nmole/min/mg인 것으로 나타났다.
- <105> 본 발명의 rPLA₂의 기질 선호도를 확인하기 위해, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액을 다양한 종류의 아라키돈산 함유 인지질과 함께 반응시켰다. 이때 활성 용출액 중의 rPLA₂는 45 μ M 2-[1-¹⁴C]AA-PC당 0.18~0.21nmol/10m에 해당하도록 하고, 각 기질은 0.9 μ M의 농도로 사용하였다. 이때 비교군으로 cPLA₂를 택하여 동일한 실험을 함께 수행하고, 그 결과를 도 5b에 나타내었다.
- <106> 도 5b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂와 마찬가지로 인지질의 sn-2 위치를 특히 선별하여 가수분해하였다.
- <107> 본 발명의 rPLA₂의 활성화에 칼슘 이온이 미치는 영향을 확인하기 위해, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액에 다양한 농도의 칼슘 이온을 첨가하여 37℃에서 5분간 반

응시킨 후, 기질로 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 첨가하여 추가로 10분간 반응시켰다. 이때 비교군으로 cPLA₂를 택하여 동일한 실험을 함께 수행하고, 그 결과를 도 5c에 나타내었다.

<108> 도 5c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂와 마찬가지로 칼슘이온에 의존적인 활성 변화를 나타냈다.

<109> 본 발명의 rPLA₂의 활성에 pH가 미치는 영향을 확인하기 위해, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액을 다양한 pH로 적정하여, 기질로 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 첨가하고 10분간 반응시켰다. 이때 비교군으로 cPLA₂를 택하여 동일한 실험을 함께 수행하고, 그 결과를 도 5d에 나타내었다.

<110> 도 5d에 나타난 바와 같이, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂와 마찬가지로 pH 9.5~10 부근에서 가장 높은 활성을 나타냈다.

<111> 본 발명의 rPLA₂의 활성에 일반적으로 알려진 효소 저해제들이 미치는 영향을 확인하기 위해, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액에 DTT(dithiothreitol), cPLA₂ 저해제인 AACOCF₃(arachidonylfluoromethyl ketone), sPLA₂ 저해제인 메파크린(mepacrine) 및 메틸수은(methyl mercury)을 각각 다양한 농도로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후, 기질로 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 첨가하여 추가로 10분간 반응시켰다. 이때 비교군으로 cPLA₂와 sPLA₂를 택하여 동일한 실험을 함께 수행하고, 그 결과를 도 5e~h에 각각 나타내었다.

<112> 도 5e~g에 나타난 바와 같이, 본 발명의 rPLA₂는 cPLA₂와 모두 비슷한 활성 변화를 나타내었으나, 메틸수은(도 5h)을 처리한 경우에는 cPLA₂보다 그 활성이 덜 저해되었으며, 염화수은에서도 cPLA₂와 다른 양상의 활성 변화를 나타냈다.

<113> 본 발명의 rPLA₂의 활성화에 조효소(cofactor)인 2가 금속 이온(divalent cation)들이 미치는 영향을 확인하기 위해, 모노 큐 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액에 Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, 및 Mg²⁺을 각각 다양한 농도로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후, 기질로 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 첨가하여 추가로 10분간 반응시켰다. 이때 비교군으로 cPLA₂와 sPLA₂를 택하여 동일한 실험을 함께 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 rPLA₂는 모든 금속 이온들에 대해 cPLA₂와 마찬가지로의 활성화 변화를 나타냈다.

<114> 따라서, 본 발명의 rPLA₂는 기존의 세포질 PLA₂와 마찬가지로의 기질 선호도, 칼슘 이온 의존도, pH 의존도 및 이가 금속이온에 대한 민감도를 나타내며, 반면 효소 저해제에 대해서는 다소 다른 반응을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

<115> [실시예 2] 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체 제조 및 이를 이용한 rPLA₂의 기능 확인

<116> 1) 본 발명의 rPLA₂ 항체 제조

<117> 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체를 제조하기 위해, 모노 큐 고성능액체 컬럼 크로마토그래피 결과 얻은 활성 용출액을 센트리 프렙(Centri-Prep, Amicon Co.)으로 5배 정도 농축시킨 후, 0.25ml 당 25μg의 단백질이 함유되도록 분주(aliquot)하였다. 상기 분주액을 동량의 CFA(complete Freund's adjuvant)와 혼합하여, BALB/c 마우스의 복강 내로 주사하였다. 3주 간격으로 4번 주사한 후, 마우스를 희생시켜 혈청을 얻고, 이후의 실험에서 이를 42KDa 단백질에 대한 항체를 함유하는 항혈청(이하 42KDa Ab라 한다)으로 사용하였다.

<118> 2) 본 발명의 rPLA₂ 항체를 이용한 rPLA₂의 아라키돈산 생성 활성 확인

<119> 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체 42KDa Ab를 이용하여 면역침전법을 수행함으로써, 본 발명의 rPLA₂가 소 적혈구에서 아라키돈산을 생성함을 확인하였다.

<120> 42KDa Ab 50 μ l를 단백질 A-세파로스 CL-4B 비드(protein A-sepharose CL-4B bead) 50 μ l와 함께 혼합하였다. 이때 대조군으로 면역반응을 일으키지 않은 마우스로부터 얻은 혈청을 사용하여, 함께 동일한 과정을 수행하였다. 상기 혼합액을 4℃에서 하룻밤 동안 항온반응시킨 후, 완충액 B(20 mM 트리스, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0%(w/v) BSA) 1ml로 6번 세척하였다.

<121> 이렇게 하여 항체를 부착시킨 비드들을 수퍼로오스 12 컬럼으로부터 얻은 활성 용출액(단백질 8.2 μ g)과 함께 4℃에서 진탕시켜주면서 10분 또는 30분간 항온반응시켰다. 비드를 1300 \times g의 속도로 4℃에서 1분간 원심분리하여 상층액과 비드 침전물을 얻었다.

<122> 우선 42KDa Ab이 본 발명의 rPLA₂에 제대로 반응할 수 있는지를 확인하기 위해, 비드 침전물을 0.1% 트윈 20과 0.5 M 염화나트륨을 함유하는 완충액 B로 6번 세척하였다. 세척된 비드를 10% 폴리아크릴아미드 겔에 걸어 전기영동 분석을 수행하고, 겔을 은염색(silver staining)하여 그 결과를 도 6a에 나타내었다.

<123> 도 6a에 나타난 바와 같이, 42KDa Ab와 수퍼로오스 12 컬럼의 활성 용출액을 반응시킨 경우에는 42KDa 크기의 단백질 밴드가 검출되었으며, 비드와 항혈청의 반응시간이 경과함에 따라 밴드의 밀도가 더욱 높아졌다. 반면 대조군에서는 면역침전시 통상적으로 나타나는 IgG 밴드들을 제외하고는 어떠한 밴드도 나타나지 않았다. 따라서 본 실시예에서 제조된 항체는 본 발명의 rPLA₂와 제대로 반응할 수 있음을 알 수 있다.

- <124> 본 발명의 항체를 이용하여 rPLA₂의 기능을 확인하기 위해, 상기 과정에서 얻은 상층액을 취해 그 안에 존재하는 PLA₂ 활성을 분석하였다. PLA₂ 활성 분석시 사용된 분석용액은 75 mM 트리스(pH 7.5) 용액에 45.0 mM 2-[1-¹⁴C]AA-GPC(110000cpm/4.5nmol), 2-AA-GPC, 4% 글리세롤(glycerol), 5 mM 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 0.2 % BSA의 조성으로 이루어진 용액 100 μ l을 사용하였으며, 그 결과를 도 6b에 나타내었다.
- <125> 도 6b에 나타난 바와 같이, 42KDa Ab와 수퍼로옥스 12 컬럼의 활성 용출액을 반응시킨 경우에는, 비드와 항혈청의 반응시간이 경과함에 따라 PLA₂ 활성이 크게 감소되었다. 반면 대조군에서는 반응시간이 경과해도 PLA₂ 활성에 거의 영향을 미치지 않았다.
- <126> 이처럼 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체가 PLA₂ 활성을 감소시키는 것으로 보아, 본 발명의 rPLA₂는 PLA₂ 활성을 지닌다는 것을 알 수 있다.
- <127> 상기 결과를 재차 확인하기 위해, 1차 페닐-5PW 컬럼 크로마토그래피까지 수행하여 부분 정제하여 얻은 적혈구의 단백질 용출액과 비드를 결합시켜 비드 침전물과 상층액을 얻었다.
- <128> 비드 침전물에 대해서, 실시예 1의 3)과 동일한 방법으로 면역침전법을 수행하였으며, 이때 1차 항체는 1:5000으로 희석한 본 발명의 42KDa Ab를 사용하여, 그 결과를 도 6c에 나타내었다.
- <129> 상층액에 대해서는, 상기와 동일한 방법으로 PLA₂ 활성을 측정하고, 그 결과를 도 6d에 나타내었다.

1020020036249

- <130> 도 6c에 나타난 바와 같이, 15번부터 18번 용출액까지 42KDa의 단백질 밴드가 검출되었으며, 17번 용출액에서 가장 높은 밀도를 나타냈다.
- <131> 이러한 결과는 17번 용출액에서 가장 높은 PLA₂ 활성이 측정된 도 6d의 결과와 일치하는 것이며, 그 외의 다른 용출액에서도 42KDa의 단백질 밴드의 밀도와 PLA₂ 활성은 비례하였다.
- <132> 따라서, 본 발명의 42KDa의 단백질은 소 적혈구의 PLA₂라는 것을 알 수 있다.
- <133> 3) 본 발명의 rPLA₂ 항체를 이용한 rPLA₂ 발현 확인 및 EPO와의 상관관계 확인
- <134> 본 발명의 rPLA₂ 항체를 이용하여 rPLA₂의 발현을 여러 세포와 조직에서 확인하고, EPO에 의해 본 발명의 rPLA₂ 발현이 유도되는지를 확인하였다.
- <135> 페닐-5PW 컬럼으로 정제된 rPLA₂, 모노 큐 컬럼으로 정제된 rPLA₂, MDCK 세포를 준비하였으며(도 7의 1, 2, 3번 라인), MFL 세포에 대해서는 EPO를 0U, 0.2U, 0.5U의 다양한 양으로 준비하여 처리하였다(도 7의 4, 5, 6번 라인). 그 외에 L929, L937 세포 및 래트의 뇌, 신장, 폐, 간 및 지라 조직을 준비하여 함께 실험을 수행하였다(도 7의 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13번 라인).
- <136> 각 세포들은 MEM 배지 1ml 당 2~3 $\times 10^6$ 개의 세포가 존재하도록 유지되면서 37°C에서 1~2주간 배양되었다. 각 조직들은 SD 수컷 래트를 희생시켜 준비하였다.
- <137> 각 세포와 조직들을 0.12M 염화나트륨을 함유하는 완충액 A에 재현탁하여, 초음파 처리에서 40W 출력, 40% 듀티 사이클(duty cycle)의 조건으로 20초간 파쇄한 후, 100000 rpm의 속도로 4°C에서 1시간 원심분리하였다. 각각 50 μ g씩의 단백질을 취해 α 42KDa로 면역침전법을 수행한 후, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

- <138> 도 7에 나타난 바와 같이, EPO의 처리량이 증가하여도 42KDa 단백질에 대한 밴드 밀도는 별다른 차이를 나타내지 않았다.
- <139> 따라서, 본 발명의 rPLA₂의 발현은 EPO에 의해 유도되지는 않음을 알 수 있다.
- <140> 4) 본 발명의 항체를 이용하여 rPLA₂가 적혈구 조혈에 미치는 영향 확인
- <141> rPLA₂가 적혈구 조혈에 미치는 영향을 확인하기 위해, 본 발명의 항체를 이용하여 rPLA₂의 발현 정도와 헤모글로빈화된 세포에서의 슈도페록시다아제 (pseudoperoxidase) 활성 간의 상관관계를 확인하였다. 슈도페록시다아제는 헤모글로빈을 지니는 세포의 표식인자로 실험에 널리 사용되어 온 효소이다.
- <142> 헤모글로빈화된 세포에서 슈도페록시다아제의 활성 변화를 확인하기 위해, 다음과 같이 MFL 세포를 배양하였다.
- <143> CD-1 마우스를 교배시킨 후, 교배일로부터 12~13 일이 되었을 때 암컷 마우스를 희생시킨 후, 태아로부터 간을 꺼내어 가늘게 찢었다. 18, 21, 13 게이지의 바늘에 순서대로 통과시켜 간세포들을 분리한 후, 글루타민(glutamine)이 함유된 α -MEM으로 2번 세척하였다. 세포들을 α -MEM 5ml에 고르게 혼합한 후, ml당 1×10^5 개의 세포가 존재하도록 DAB(diaminobenzidine) 혼합액에 섞어 배양하였다. 이때 DAB 혼합액은 α -MEM, 0.8% 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 20% FBS(fetal bovine serum), 10^{-4} M 머캅토에탄올, 100U/ml 페니실린(penicillin), 100mg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 함유되었으며, 실험군에는 0.2U/ml 인간 재조합 EPO(특이 활성>160,000 U/mg)도 함유되도록 제조하였다.

- <144> DAB 염색을 위해, DAB 혼합액 1ml을 10 × 85mm 페트리 디시(petri dish)에 깔아준 후, 95% 공기와 5% CO₂의 조건 하에서 축축한 환경을 유지해 주면서 배양하였다. 3일 또는 7일이 지난 후, DAB과 과산화수소를 이용하여 슈도페록시다아제를 염색하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- <145> 도 8에 나타난 바와 같이, 배양 3일 후(도 8b, 도 8c) 단일 세포는 배양 시작 시기(도 8a)에 비해 크게 줄어들었으며, 10~20 개 정도의 세포들이 수많은 유사분열체를 이루어 콜로니를 형성하였다. 대부분의 콜로니들은 DAB에 의해 갈색으로 염색되어 헤모글로빈화되었음을 알 수 있다. 반면 배양 7일 후(도 8d, 도 8e)에는 콜로니들이 거의 사라졌다.
- <146> EPO를 첨가하지 않은 경우(도 8b, 도 8d)와, EPO를 첨가한 경우(도 8c, 도 8e)는 세포의 헤모글로빈화에 있어 별다른 차이를 나타내지 않았으며, EPO를 첨가한 경우 콜로니가 보다 많이 생성되는 것을 알 수 있다(도 8c).
- <147> 상기 결과가 본 발명의 rPLA₂의 발현 여부와 상관이 있는지를 확인하기 위해, 상기 와 같이 배양된 MFL 세포로부터 얻은 단백질을 얻었다. rPLA₂ 또는 cPLA₂에 대한 항체를 각각 이용하여 실시예 2의 2)와 동일한 방법으로 면역침전법을 수행하고 그 결과를 도 9a와 도 9b에 각각 나타내었다. 이때, 도 8a의 세포로부터 얻은 단백질은 1번 레인, 도 8b는 2번 레인, 도 8c는 3번 레인, 도 8d는 4번 레인, 도 8e는 5번 레인에 걸고, 양성 대조군은 6번 레인에 걸어 각 단백질 밴드의 밀도를 비교하였다.
- <148> 도 9a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 rPLA₂는 배양 후 3일까지 발현되다가, 배양 7일 무렵에는 발현되지 않았다. 이러한 결과는 도 8에 나타난 세포의 헤모글로빈화 양상과 일치하는 것으로, 본 발명의 rPLA

1020020036249

2 가 활성화됨에 따라 MFL 세포로부터 적혈구의 조혈이 유도된다는 것을 알 수 있다.

<149> 반면 도 9b에 나타난 바와 같이, cPLA₂는 배양 일수가 증가함에 따라 차츰 발현이 증가되었으므로, cPLA₂는 MFL 세포의 적혈구 분화에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다

<150> [실시예 3] 본 발명의 rPLA₂ 저해제 EA4 제조 및 이를 이용한 rPLA₂의 기능 확인

<151> 1) 본 발명의 rPLA₂ 저해제 EA4 제조

<152> 본 발명의 rPLA₂의 저해제를 다음의 방법에 의해 제조하였다.

<153> 5, 8-퀴놀린디온과 큐프릭 아세테이트 모노하이드레이트가 각각 6.28mmol의 농도로 녹아있는 아세트산 용액 80ml을 준비하였다. 상기 용액에 디에틸아닐린이 6.28mmol의 농도로 녹아있는 아세트산 용액 20ml을 혼합하여 상온에서 2시간 동안 교반시키고, 하룻밤 동안 방치하였다. 혼합 용액을 여과하여 침전물을 얻어, 이를 EA4라 명명하였다. EA4의 구조는 화학식 1에 나타나있다.

<154> 2) 본 발명의 rPLA₂ 저해제 EA4의 rPLA₂ 저해 활성 확인

<155> 본 발명의 EA4가 rPLA₂를 저해할 수 있는지를 확인하기 위해, 그 비교군으로서 cPLA₂ 저해제인 TP1을 제조하였다.

<156> rPLA₂와 cPLA₂를 정제하여 준비한 후, 5 μ l DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 각 저해제를 첨가하여 37℃에서 10분간 항온반응시켰다. 기질인 2-[1-¹⁴C]AA-PC를 첨가하여 추가로 30분간 항온반응시킨 후, 활성 저해 정도를 측정하여 그 결과를 도 10a에 나타내었다.

1020020036249

- <157> 도 10a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 EA4는 rPLA₂와 cPLA₂의 활성을 모두 효과적으로 저해한 반면, TP1은 cPLA₂의 활성만 저해하였다.
- <158> 본 발명의 EA4가 rPLA₂를 저해하는 기작을 규명하기 위해, 딕슨 플롯(Dixon plot)을 작성하여 도 10b에 나타내었다.
- <159> 도 10b에 나타난 바와 같이, K_i 는 130 μ M이었으며, 경쟁적으로 rPLA₂의 활성을 저해함을 알 수 있다.
- <160> 3) 본 발명의 rPLA₂ 저해제 EA4를 이용한 rPLA₂의 아라키돈산 생성 활성 확인
- <161> 본 발명의 EA4를 이용하여 적혈구에서 rPLA₂가 아라키돈산 생성에 관여하는지를 확인하였다.
- <162> 실시예 1의 1)과 같은 방법으로 사람과 소의 적혈구를 각각 준비하고, 대조군으로 L929 세포도 함께 준비하였다. 각 세포들을 [³H]AA로 표식한 후, 세포를 MEM 배지로 3번 세척하여 남은 [³H]AA를 제거하였다. DMSO에 50 μ M의 농도로 녹인 저해제를 각각 첨가하여 20분간 항온반응시킨 후, 37℃에서 2 μ M의 A23187과 함께 반응시켰다. 이때 대조군은 저해제와 A23187 대신, 각각 2 μ l의 DMSO를 첨가하였다.
- <163> 반응 후 10분 간격으로 세포를 취하여 원심분리한 후, 액체섬광계수기를 이용하여 방사능을 측정하고 그 결과를 도 11a~c에 각각 나타내었다.
- <164> 사람 적혈구(도 11a)와 소 적혈구(도 11b)에서는 실시예 1의 1)에서 확인되었던 A23187에 의한 아라키돈산 분비가 EA4에 의해 현저하게 억제되었다. 반면 TP1은 A23187에 의한 아라키돈산 분비를 억제하지 못했다.

<165> 한편 L929 세포에서는 두 저해제 모두 A23187에 의한 아라키돈산 분비를 억제하였다(도 11c). 이는 L929 세포에 두 저해제에 의해 활성이 모두 저해되는 cPLA₂가 존재하기 때문이다.

<166> 따라서, 본 발명의 rPLA₂는 적혈구에서 A23187에 의한 아라키돈산의 분비에 관여함을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<167> 본 발명의 rPLA₂는 소 적혈구에서 칼슘 의존적으로 인지질을 아라키돈산으로 분해하여 분비함으로써, 적혈구와 관련된 생리 작용을 조절할 수 있다.

<168> 본 발명의 rPLA₂에 대한 항체는 본 발명의 rPLA₂와 사람 적혈구의 42KDa 단백질에 특이적으로 결합할 수 있으며, 본 발명의 EA4는 rPLA₂의 활성을 효과적으로 저해할 수 있다.

<169> 따라서, 본 발명의 rPLA₂와 그에 대한 항체 및 저해제는 적혈구가 관여하는 생리 현상의 연구 분야 및 rPLA₂와 관련된 질환의 진단, 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

적혈구 세포질에서 유래하며, 칼슘 이온에 의존적으로 아라키돈산을 생성하며, SDS-PAGE에 의해 측정 한 분자량이 42KDa이며, 전기영동 하에서의 등전점이 pH 3.9~4.1이며, pH 9.5~10에서 최고의 활성을 나타내며, 특이 활성도(specific activity)는 5.6 nmol/min/mg임을 특징으로 하는 포스포리파아제 에이 투 효소 (rPLA₂)

【청구항 2】

제 1항에 있어서, DTT(dithiothreitol), 메파크린(mepacrine), 메틸수은(methyl mercury), 염화수은(mercuric chloride) 및 TP1(2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chloro-1,4-naphthalene dione)에 의해서는 그 활성이 저해되지 않으나, cPLA₂ 저해제인 AACOCF₃(arachidonylfluoromethyl ketone)에 의해서는 그 활성이 저해되고, Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, 및 Mg²⁺ 등 2가 금속 이온 (divalent cation)에 의해 활성화됨을 특징으로 하는 rPLA₂

【청구항 3】

제 1항에 있어서, cPLA₂에 대한 항체 또는 sPLA₂에 대한 항체와 반응하지 않음을 특징으로 하는 rPLA₂

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 효소는 사람 또는 소에서 유래함을 특징으로 하는 rPLA₂

【청구항 5】

적혈구를 파쇄하여 얻은 세포질 분획을 부틸 토요필 소수성 컬럼, 1차 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼, DEAE-5PW 고압액체 컬럼, 세파아크릴 S-300 젤 여과 컬럼, 2차 페닐-5PW 소수성 고압액체 컬럼, 수퍼로오스 12 젤 여과 고성능액체 컬럼 및 모노 큐 고성능액체 컬럼을 순서대로 이용하여 정제하여 얻음을 특징으로 하는 rPLA₂의 제조 방법

【청구항 6】

제 5항의 방법에 의해 제조된 rPLA₂를 동량의 보조제(adjuvant)와 혼합하여 마우스에 주사한 후, 마우스의 혈청으로부터 얻는 항체임을 특징으로 하는, rPLA₂에 대한 항체

【청구항 7】

제 6항에 있어서, cPLA₂ 또는 sPLA₂와는 반응하지 않음을 특징으로 하는, rPLA₂에 대한 항체

【청구항 8】

제 3항의 방법에 의해 제조된 rPLA₂를 동량의 보조제와 혼합하여 마우스에 주사한 후, 마우스로부터 혈청을 얻음을 특징으로 하는, rPLA₂에 대한 항체의 제조 방법

【청구항 9】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 효소에 대한 항체 또는 저해제를 유효 성분으로 하는 rPLA₂ 저해제

【청구항 10】

제 9항에 있어서, rPLA₂의 과잉 활성화에 의해 유발되는 질병의 진단, 예방 및 치료제

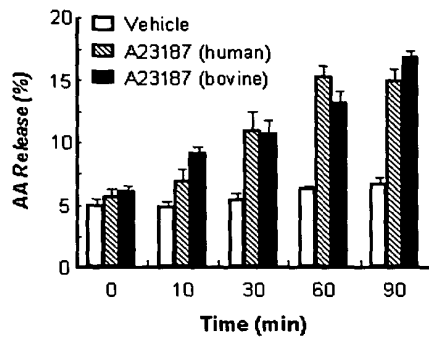


1020020036249

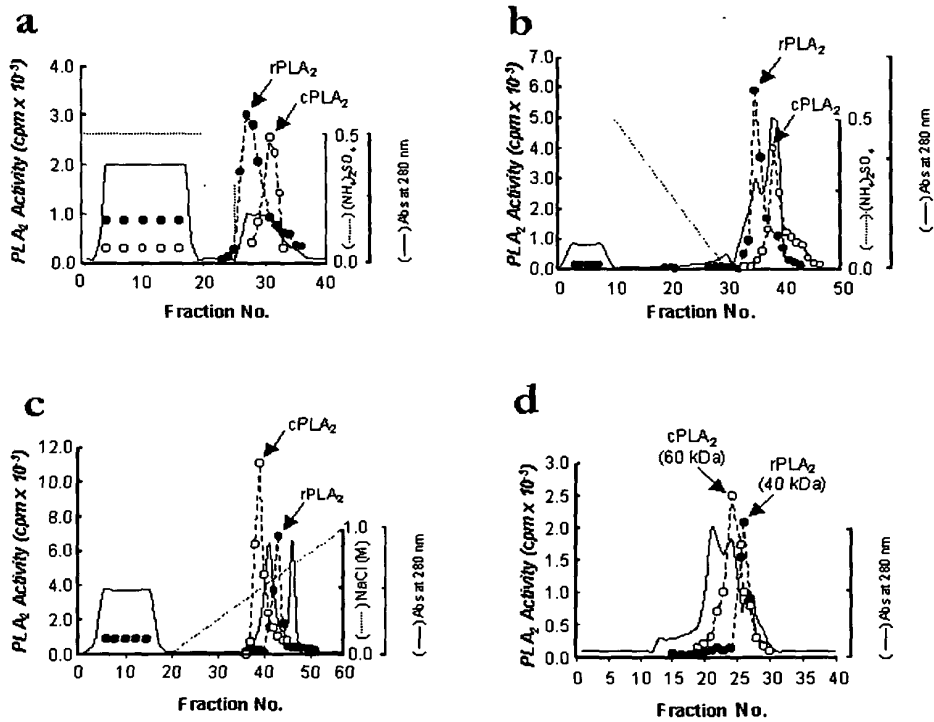
출력 일자: 2003/6/25

【도면】

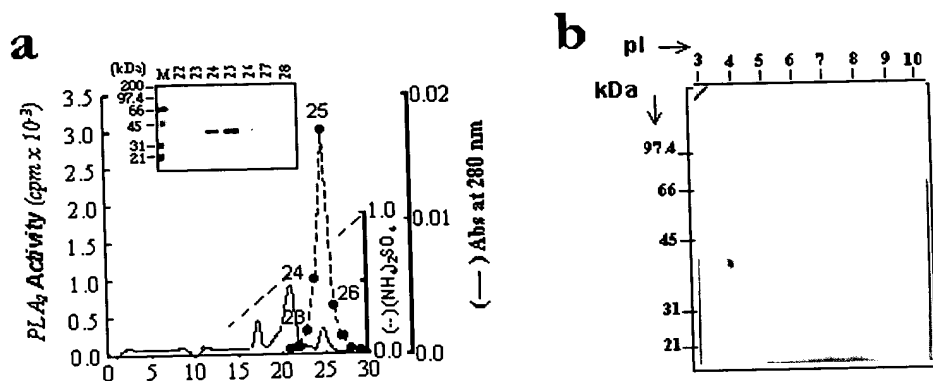
【도 1】



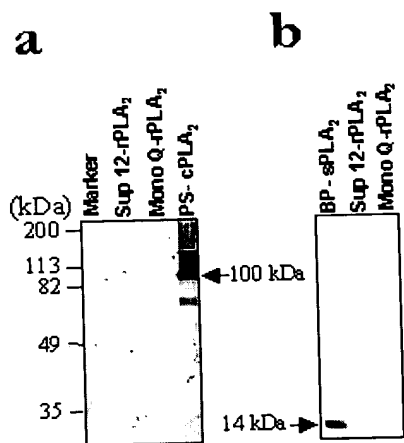
【도 2】



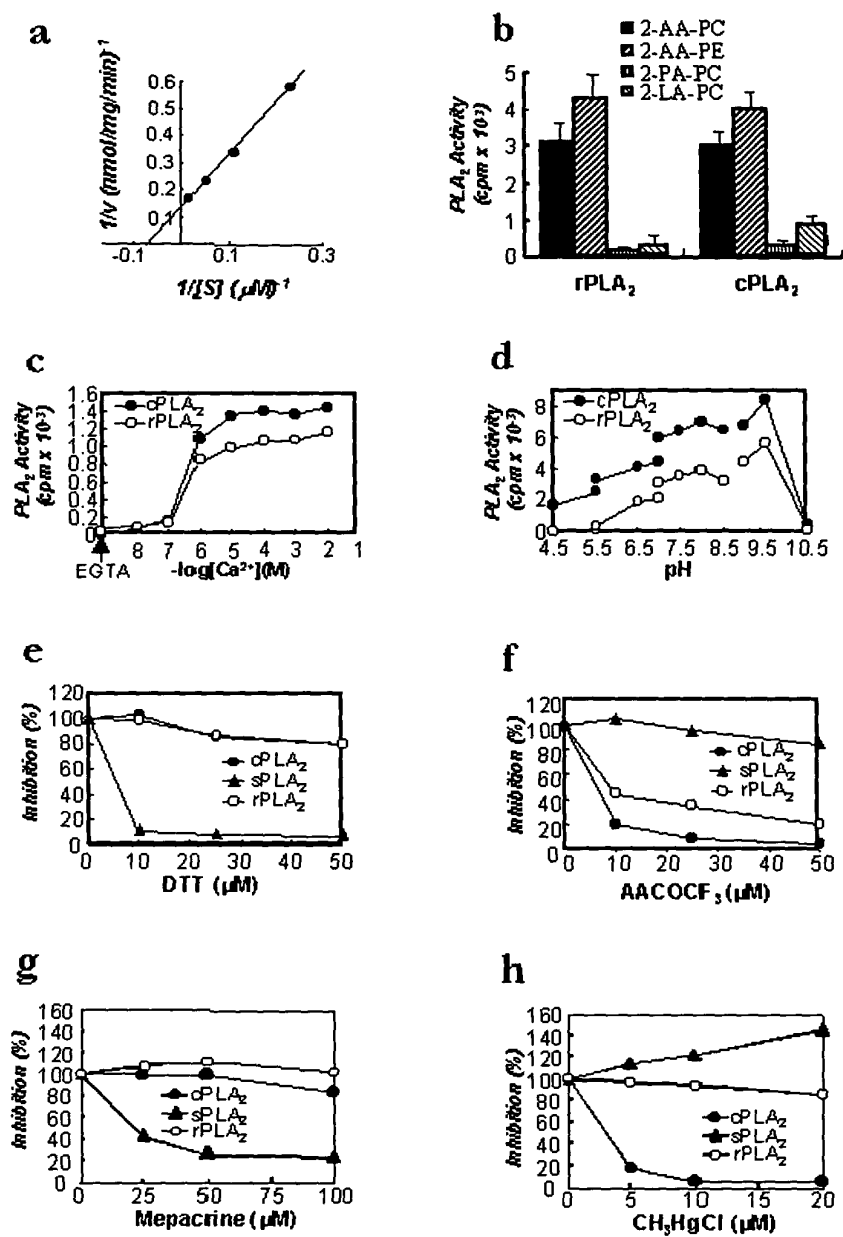
【도 3】



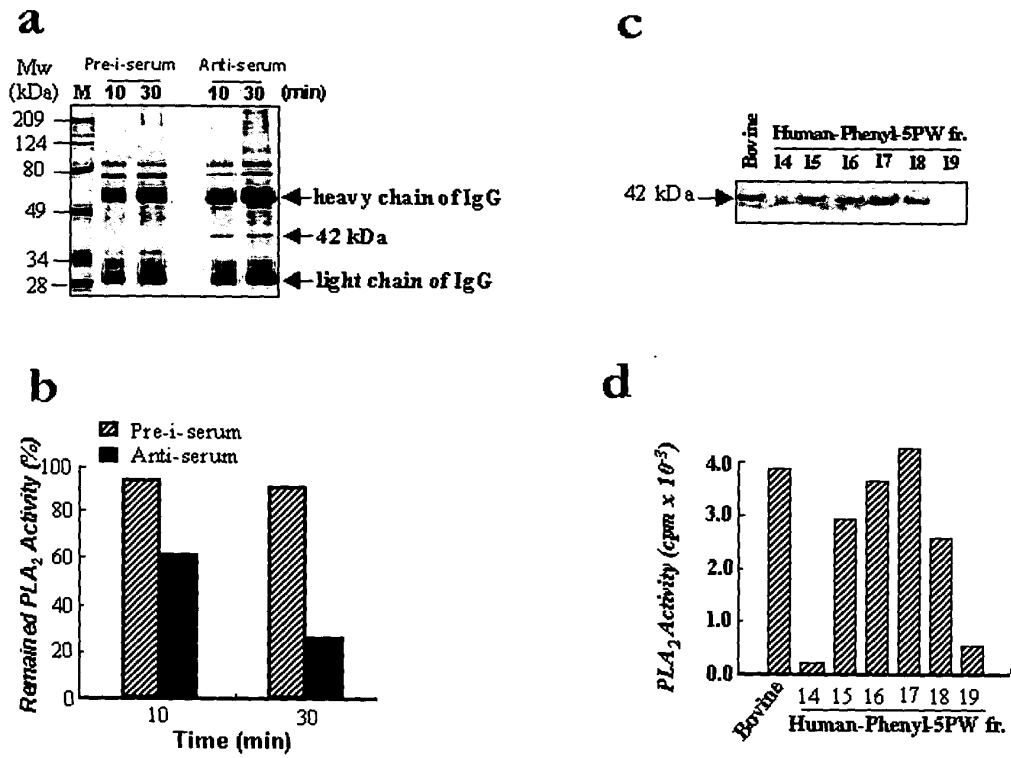
【도 4】



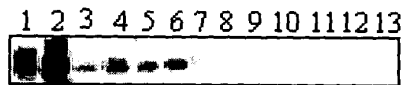
【도 5】



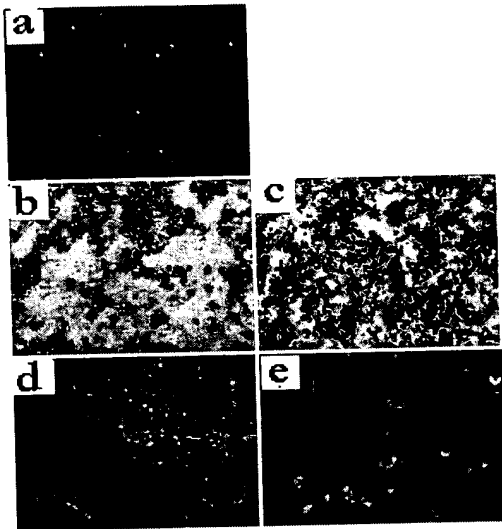
【도 6】



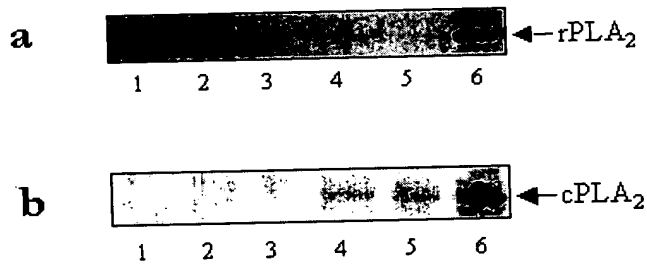
【도 7】



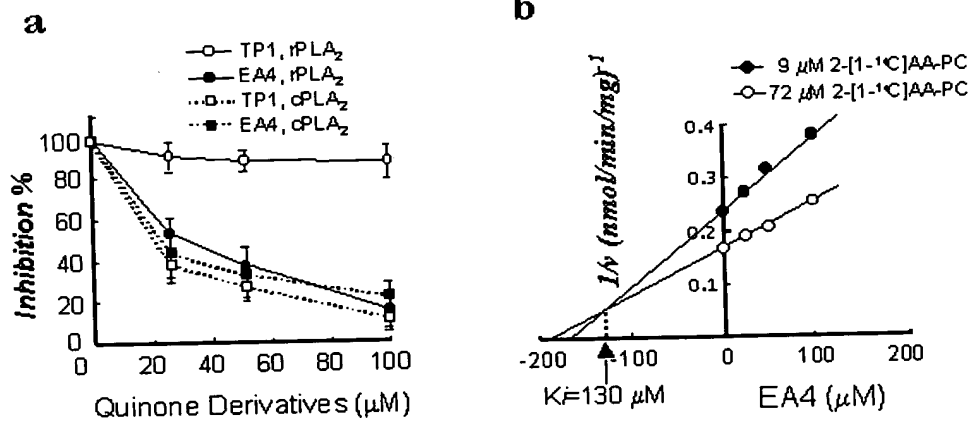
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【도 11】

